

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor : Prof. Dr. W. Schmid

Induktion cytologischer Veränderungen unter Phenobarbital-Natrium und ihre Reversion bei der weißen Maus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Erna Palme
aus Trschons

Marburg/Lahn 1973

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor : Prof. Dr. W. Schmid

Induktion cytologischer Veränderungen unter Phenobarbital-Natrium und ihre Reversion bei der weißen Maus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Erna Palme
aus Trschons

Marburg/Lahn 1973



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 17. Juli 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. Oepen

Referent: Prof. Dr. med. W. Schmid

Correferent: Dr. med. habil. G. Schaude

Inhalt

	Seite
Einleitung	1
<u>A) Methodik</u>	3
I. Tiermaterial	3
II. Substanzapplikation	3
III. Versuchsablauf	4
IV. Tötung der Tiere und Präparategewinnung	5
V. Histologische Aufarbeitung der Präparate	6
VI. Auswertung der histologischen Schnitte	7
VII. Statistische Auswertung	8
 <u>B) Versuchsergebnisse</u>	 9
I. Körpergewicht	9
II. Abwolutes Lebergewicht	9
III. Relatives Lebergewicht	10
IV. Cytologische Änderungen während Phenobarbitalapplikation und im Reversionsstadium	16
1. Parenchym	16
a) Gesamtzellzahlen/Flächeneinheit	16
b) Anzahl der Doppelkernigen/Flächeneinheit	18
c) Mitose-Index	21
d) Nekrose-Index	22
e) Fusions-Index	23
f) Differenzierung des Leberläppchens nach der Zellzahl	26
2. Extraparenchym	31
C) Diskussion	33
D) Zusammenfassung	37
Literaturverzeichnis	43



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung:

Eine große Anzahl von Untersuchungen, unter denen vor allem CONNEY et al. 1963, REMMER und MERKER, 1963 und KUNZ et al. 1966 zu nennen sind, haben gezeigt, daß von den körperfremden Substanzen, die eine Lebervergrößerung bewirken, das Phenobarbital besonders wirksam ist. Dabei ist die Vergrößerung des Organs abhängig von der Dosis und von der Dauer der Einwirkung.

Man hat das Phenobarbital-Natrium deshalb immer wieder als Modell für die fremdstoffinduzierte Lebervergrößerung herangezogen. (FONDS und ROGERS 1964, ORENIUS et al. 1965, STÄUBLI et al. 1968).

Morphologische und biochemische Untersuchungen zeigten, daß es sich bei dieser Vergrößerung um eine echte Zellhypertrophie handelt. (STEGMANN und PEINE 1960, REMMER und MERKER 1963, KUNZ et al. 1966, PREIS et al. 1966, SCHAUDE et al. 1967). Es wurden Steigerungen der RNS-Synthese, der DNS-Synthese und des Proteingehaltes der Leber, sowie der, für die einzelnen Zellräume nach BÜCHER und KLINGENBERG 1958, PETTE 1968, repräsentativen Enzyme gefunden. Nach Absetzen des induzierenden Agens ist die Leberhypertrophie voll reversibel (KUNZ et al. 1966).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es

1. die unter Phenobarbital-Natrium-Applikation auftretende

Leberzellvergrößerung bei der weißen Maus quantitativ zu verfolgen und gleichzeitig innerhalb des Hepatons zu analysieren.

2. sollte die Reversion der Veränderungen nach Absetzen der Substanz untersucht werden, wobei vor allem die Zeitdauer, in welcher die Rückbildung erfolgt, von Interesse war..

3. war zu prüfen, welche Rolle der Zellumsatz (Zellneubildung und Zellverfall) während der Induktions- und Reversionsphase spielt.

A Methodik

I Tiermaterial:

Die Versuche wurden an 70 ausschließlich männlichen Albinomäusen vom Reinzuchtstamm NMR der Versuchstierzucht Ivanovas Kisslegg/Allgäu durchgeführt. Das Gewicht der Tiere schwankte zu Versuchsbeginn zwischen 25 und 40 g. Die Tierhaltung erfolgte im Kunstlichtstall mit einem Licht-Dunkelrhythmus von 12 Stunden bei einer Raumtemperatur von 23°C.

Es wurden 14 Gruppen von je 5 Tieren gebildet, die in Macrolonkäfigen gehalten wurden. Als Streu dienten Sägespäne. Die Tiere erhielten als Standardkost "Sniff" Mäusefutter der Firma Plange Soest und Wasser aus Saugflaschen ad libitum.

II Substanzapplikation:

Um eine möglichst konstante und über längere Zeiträume durchführbare Zufuhr der Testsubstanz zu ermöglichen, wurde Phenobarbital den Tieren in der Trinkflüssigkeit angeboten (eine 0,1%ige Phenobarbitallösung, die täglich frisch hergestellt wurde). Aus der mittleren Tagestrinkmenge von 0,2 ml/g Körpergewicht (KG) Maus und der Konzentration des Phenobarbitals in der Trinkflüssigkeit ließ sich die mittlere aufgenommene Substanzmenge pro kg KG folgendermaßen errechnen: 1 mg Phenobarbital entspricht 1 ml Trinkflüssigkeit und 5 g Maus. Die aufgenommene Phenobarbitalmenge pro kg Maus ist somit

$$x = \frac{1000 \text{ g} \times 1 \text{ mg}}{5 \text{ g}}$$

$$x = 200 \text{ mg Phenobarbital/kg Maus}$$

Die täglich aufgenommene Phenobarbitalmenge betrug bei einer 30 g schweren Maus im Mittel 60 mg.

Durch die Verabfolgung von Phenobarbital mit der Trinkflüssigkeit standen die Tiere unter ständiger Einwirkung des Pharmakons. Diese Dosis beeinflusste den normalen Tagesrhythmus der Tiere nicht. Lediglich die physiologische Schlaftiefe schien etwas verstärkt.

III Versuchsablauf:

Die gesamte Versuchsanordnung erfolgte nach einem genauen Zeitplan, um im Hinblick auf die jahreszeitlichen und tageszeitlichen Schwankungen des Zellbildes möglichst exakt vergleichbare Daten zu erhalten.

Bei Versuchsbeginn wurde das Tiergewicht auf einer Mettler-Tierwaage Modell K 4 (0,1 g genau ablesbar) bestimmt.

Die einzelnen Tiergruppen wurden danach am Ohrläppchen durch Einschnitte gezeichnet. Während des Versuchsverlaufes wurden wöchentliche Gewichtskontrollen der Tiere durchgeführt. Jede Gruppe erhielt täglich (12 Uhr) frische Trinkflüssigkeit, die aufgenommene Flüssigkeitsmenge wurde durch Wiegen der gefüllten Trinkflaschen und Rückwiegen am darauffolgenden Tag ermittelt.

Nach der gewünschten Einwirkungsdauer von Phenobarbital wurden die Tiere jeweils gegen 12 Uhr dekapitiert, um die höchste Mitosewelle im Circadianrhythmus zu erfassen.

Es wurde je eine Gruppe nach 1, 2, 5, 10 und 15-tägiger Applikation von Phenobarbital untersucht.

Nach 15 Tagen wurde unter Einhaltung des Zeitplanes um 12 Uhr die Phenobarbitalzufuhr bei den noch im Versuch stehenden Tiergruppen (insgesamt noch 7 Gruppen) gestoppt. Die Tiere erhielten jetzt wieder Leitungswasser als Trinkflüssigkeit. Einen Tag, 2, 5, 8, 12, 22 und 50 Tage nach Beendigung der Phenobarbitalapplikation erfolgte wiederum die Tötung jeweils einer Tiergruppe.

Bei Versuchsbeginn und Versuchsabschluß wurde zum Vergleich je eine Kontrollgruppe getötet.

IV Tötung der Tiere und Präparatgewinnung

Bei Versuchsende der jeweiligen Tiergruppe wurden die Mäuse gewogen und danach durch Scherenschlag dekapitiert und entblutet. Andere Tötungsarten wie Narkose oder Abdrücken des Genickes waren bereits bei der Durchführung früherer Versuche (Dissertation PREIS 1965, THAL 1966) als unzuverlässig erachtet worden, da es dabei zu einer Gewichtszunahme der Leber durch Blutstauung gekommen war. Nach dem Ausbluten wurden die Tiere aufgespannt und durch Median- und Transversalschnitt der Bauchraum eröffnet. Die Leber wurde von dem umgebenden Bindegewebe und den Nachbarorganen freipräpariert, insbesondere wurde darauf geachtet, die Gallenblase und das Zwerchfell in toto zu entfernen. Dann erfolgte das vorsichtige Herausheben der Leber und Gewichtsbestimmung derselben auf einer Sartorius-Feinwaage

(1 mg Genauigkeit). Aus dem rechten Leberlappen wurde danach ein Teil zur histologischen Untersuchung entnommen und in 10%iger säurefreier Formaldehydlösung fixiert.

V Histologische Aufarbeitung der Präparate

Nach 24-stündiger Fixierung der Präparate in 10%igem Formalin erfolgte ca. 24-stündiges Wässern der Organe in fließendem Wasser, um eine spätere Beeinträchtigung der Färbung durch Reste von Formalin zu verhindern. Danach wurden die Lebern in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50,70,90%igem und 2x absolutem Alkohol) entwässert und über Chloroform in Paraffin (60°C) übergeführt. Das Durchtränken mit Paraffin erfolgte im Vakuum bei 60°C. Nach 12-stündigem Verbleiben im Paraffin wurden die Präparate ausgegossen und nach dem Erstarren aufgeblickt. Die Herstellung von 5 μ -dicken Schnitten wurde mit einem Grundschlitten-Mikrotom der Firma Leitz durchgeführt. Die Schnitte wurden auf fettfreie, mit Eiweißglyzerin bestrichene Objektträger aufgezogen und anschließend im Wärmeschrank bei 37°C aufgetrocknet.

Die Färbung der Präparate erfolgte nach vorhergehender Entparaffinierung in Xylol mit der PAS-Reaktion (Periodic acid schiff Reaktion) nach Mc Manus.

VI Auswertung der histologischen Schnitte

Zur histologischen Auswertung wurde das Ortholux-Mikroskop der Firma Leitz, Wetzlar mit Objektiv 1:100 (Ölimmersion) und Periplanocular 16 benützt. Bei dieser Vergrößerung hatte ein Gesichtsfeld die Fläche von 0,012 qmm. Es wurden je Präparat die Leberzellzahl einschließlich der Doppelkernigen, die Mitosen, die Fusionen, die Nekrosen und die Extraparenchymzellen in je 1000 Gesichtsfeldern, entsprechend einer Fläche von 12 qmm, ausgezählt. Die am oberen und linken Gesichtsfeld angeschnittenen Kerne wurden dabei jeweils mitgezählt, die am rechten und unteren Rand vernachlässigt. Zur Auszählung nahmen wir das Registriergerät "Leukodiff MS" der Firma Boskamp Bonn zu Hilfe. Bei der Einstellung der Gesichtsfelder wurde darauf geachtet, daß möglichst homogene Flächen ohne stärkere Extraparenchyman-sammlung, ohne größere Gefäße und Glissonsche Dreiecke zur Auswertung kamen. Randbezirke der Präparate wurden bei der Auszählung wegen ihrer stärkeren Schrumpfung unberücksichtigt gelassen. Nur die mit Kern geschnittenen Leberzellen wurden gezählt. Im einzelnen erfolgte die Zählung in 1000 Gesichtsfeldern folgendermaßen:

Zählung aller angeschnittenen Leberzellkerne,

Zählung aller Doppelkernigen und Errechnen der Gesamtzellzahlen durch Bilden der Differenz zwischen Leberzellkernen und Doppelkernigen.

Zählung der Mitosen.

Zählung der Fusionsfiguren.

Zählung der Nekrosen (nekrotische Zellen)

Zählung der angeschnittenen Bindegewebskerne (BK).

Isolierte Zellzählung im Läppchenzentrum, Intermediärraum sowie in der Läppchenperipherie. Dabei wurden jeweils 10 Gesichtsfelder pro Präparat und Zone ausgewertet.

VII Statistische Auswertung

Die Mittelwerte eines Tierkollektivs wurden jeweils nach folgenden Formeln errechnet:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$\bar{x}$ = Mittelwert

x_i = Einzelwert

n = Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe

Die Streuung der Einzeltiere um den Mittelwert eines Tierkollektivs wurde wie folgt berechnet:

$$s^2_{\bar{x}} = \frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n - 1}$$

Zur Prüfung der Signifikanz der einzelnen vergleichbaren Mittelwerte untereinander wurde der t-Test nach STUDENT angewandt:

$$t = \frac{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}) - (\sum \bar{x}^2 - \frac{(\sum \bar{x})^2}{n'})}{n + n' - 2} \cdot \frac{n + n'}{n \cdot n'}$$

$\bar{x}$ = Gruppenmittelwert, n = Anzahl der Einzelwerte,

$\bar{x}'$ = Vergleichsmittelwert, n' = Anzahl der Vergleichswerte

Die Wahrscheinlichkeit p wurde aus den Geigy-Tabellen nach dem jeweiligen Freiheitsgrad ($n_1 + n_2 - 2$) abgelesen.

Ein $p < 0,05$ (95%ige Wahrscheinlichkeit) wurde als statistisch gesichert betrachtet. Alle Berechnungen wurden in der zentralen Rechenanlage Marburg nach FORTRAN am TR4 ausgeführt. (Dr. rer. nat. OVERHOF).

B Versuchsergebnisse

Die mit Phenobarbital behandelten Tiere zeichneten sich in ihrem Allgemeinverhalten durch leichte Aggressivität gegenüber den Kontrolltieren aus. Das Fell war unauffällig, glänzend und glatt.

I. Körpergewicht:

Da das Ausgangsgewicht der Versuchstiere nicht einheitlich war, sondern zwischen Werten von 25-40 g schwankte, wurde auf eine statistische Auswertung desselben verzichtet. In früheren Arbeiten (Dissertation THAL 1966) wurden jedoch bei Körpergewichtskontrollen unter Phenobarbital im Streubereich der Kontrollen liegende Werte gefunden.

II. Absolutes Lebergewicht:

Gegenüber den Kontrolltieren, die ein absolutes mittleres Lebergewicht von 1980 mg aufweisen, steigt das Lebergewicht bei den mit Phenobarbital behandelten Tieren stark an. Der Gewichtsanstieg beträgt ca. 1000 mg nach 15 Tagen Substanzapplikation. Nach Absetzen des Präparates kann erstmals nach 2 1/2 Tagen ein Absinken des absoluten Lebergewichtes registriert werden. Die Differenz beträgt im Mittel 300 mg. Nach 5-tägigem Absetzen liegt das absolute Lebergewicht im Mittel nur noch 200 mg über dem der Kontrollen. Am 12.Tag nach Absetzen des Phenobarbitals liegen die absoluten Lebergewichte wieder im Bereich der Kontrolltiere.

III. Relative Lebergewichte:

Die relativen Lebergewichte, errechnet in mg Lebergewicht pro g Körpergewicht liegen bei den Kontrolltieren mit 50,2 mg pro g im Bereich von bereits in früheren Arbeiten ermittelten Werten. Nach Phenobarbitalverabfolgung steigen sie rasch an. Bereits nach 24 Stunden Phenobarbitaleinwirkung liegt der Wert bei 55 mg pro g und ist gegenüber den Kontrollen damit statistisch signifikant ($p < 0,05$) erhöht. Nach 2 Tagen erreichen die relativen Lebergewichte Werte von 65 mg pro g mit einer Signifikanz gegenüber den Kontrollen von $p < 0,001$. Danach steigt das relative Lebergewicht langsamer an und hat am 5.Tag 74,3 mg pro g und am 10.Tag 87,4 mg pro g erreicht. Nach 15 Tagen ist das relative Lebergewicht mit 96,2 mg pro g nahezu auf das Doppelte des relativen Lebergewichtes der Kontrollen angestiegen.

Nach Absetzen des Phenobarbitals ist ein rasches Absinken der relativen Lebergewichte zu verzeichnen. Bereits 1 1/2 Tage nach Absetzen der Substanz hat der Wert von 87,1 mg pro g einen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der 15 Tage lang mit Phenobarbital behandelten Gruppe erreicht. ($p < 0,05$)

Nach 2 1/2 Tagen ist das relative Lebergewicht mit Signifikanz gegenüber den 15 Tage Werten bei einem $p < 0,001$ auf 73,2 mg pro g abgesunken. Der Abfall des relativen Lebergewichtes nach Behandlungsende geht somit schneller vor sich als der Anstieg unter Phenobarbitalgabe. Das weitere Absinken erfolgt jedoch langsamer,

die relativen Lebergewichte liegen nach 5 Tagen mit 63,2 mg pro g und nach 8 Tagen mit 58,1 mg immer noch signifikant höher ($p < 0,01$) als die Kontrollen. Erst nach 12 Tagen ist mit einem Wert von 54,2 mg pro g gegenüber den Kontrolllebern kein signifikanter Unterschied mehr vorhanden. Nach 20 und 50 Tagen findet keine wesentliche Gewichtsänderung mehr statt.

Wie auch auf Abbildung 1 ersichtlich, erfolgt also sowohl der Anstieg der relativen Lebergewichte nach Beginn der Phenobarbitaleinwirkung als auch das Absinken in den ersten 5 Tagen schneller, um dann nur noch allmählich anzusteigen bzw. abzusinken. Die mit in die Auswertung einbezogenen 18 und 30 Wochen lang behandelten Phenobarbitaltiere liegen mit Werten von 81 bzw. 82 mg pro g unter dem in unserer Versuchsserie ermittelten Wert von 96 mg pro g nach 15 Tagen Phenobarbitaleinwirkung. Da es sich jedoch hierbei um getrennte Versuchsserien handelt, (insbesondere waren die früheren Versuche in Taglichtställen durchgeführt worden) sind die Werte nicht direkt vergleichbar. Die Reversibilität wurde bei dieser Serie nicht untersucht.

Abb. 1

I. Zählergebnisse aus der Leber der Maus (♂)

Während 15-tägiger Behandlung mit Phenobarbital-Natrium
und in der Reversionsphase.

II. Zählergebnisse nach 18-und 30-wöchiger Behandlung.

A Mitosen _____
Nekrosen -.-.-.-.-.
Kernatypien _____
(Indices)

/ pro 1000
Gesichtsfelder

B Zelldichte III-----
Relatives Lebergewicht -.-.-

C Analyse der Zelldichte in den einzelnen Läppchenzonen

Weißer Säulenanteil = einkernige Zellen

Schwarzer Säulenanteil = doppel-und mehrkernige Leber-
zellen.

Ausgezogene Kurve =

Änderung des prozentualen Anteils zwei-und mehrkerniger
Leberzellen bezogen auf die Zahl einkerniger Leberzellen
während des Versuchsverlaufs.

Das histologische Bild der Leber
unter der Einwirkung von Phenobarbital-Na
und in der Reversionsphase
nach Absetzen der Substanz

Formalinfixierte Paraffinschnitte,
PAS-Reaktion

Vergrößerung: Orthomat-Objekt 1:10, Okular 10
Tierhaltung KS, Tötung 12 Uhr

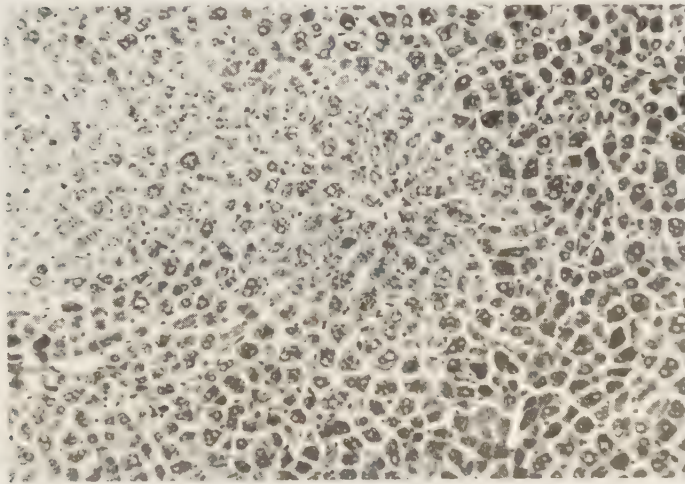


Abb. 2
Kontrolle

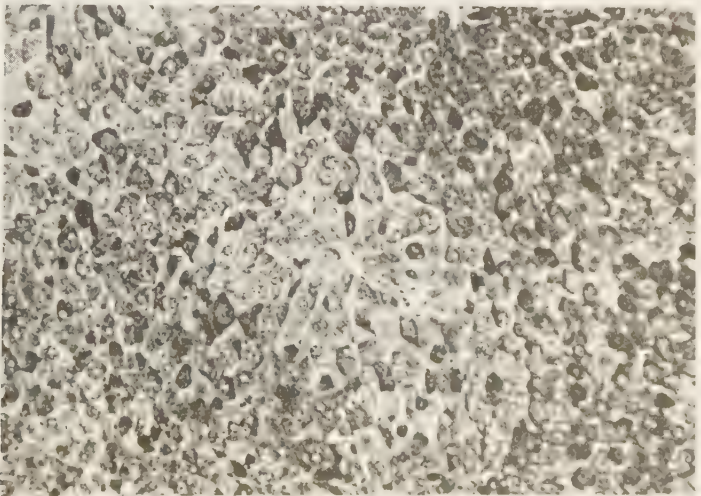
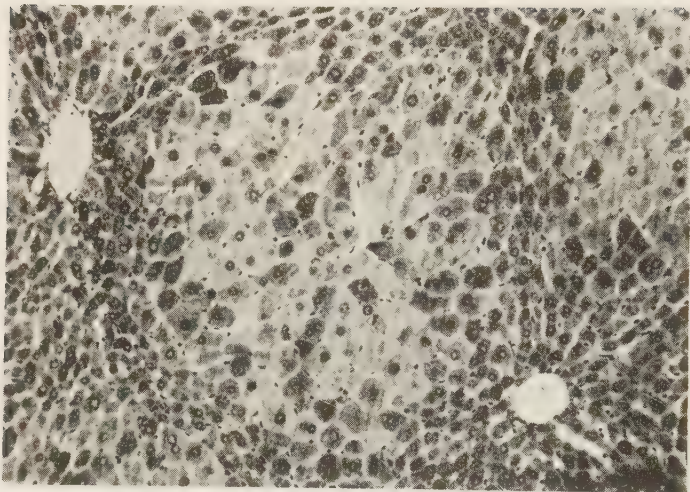


Abb. 3
5 Tage
Phenobarbital-
gabe

Abb. 4

15 Tage Phenobarbitalgabe



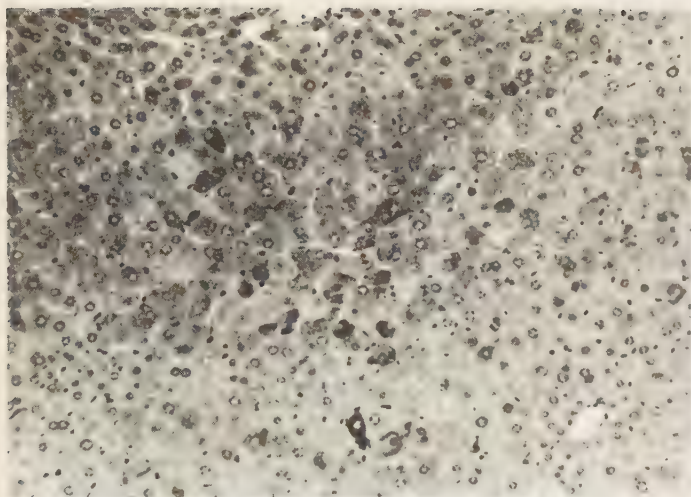


Abb. 5
12 Tage
nach Absetzen
des Phenobar-
bitals

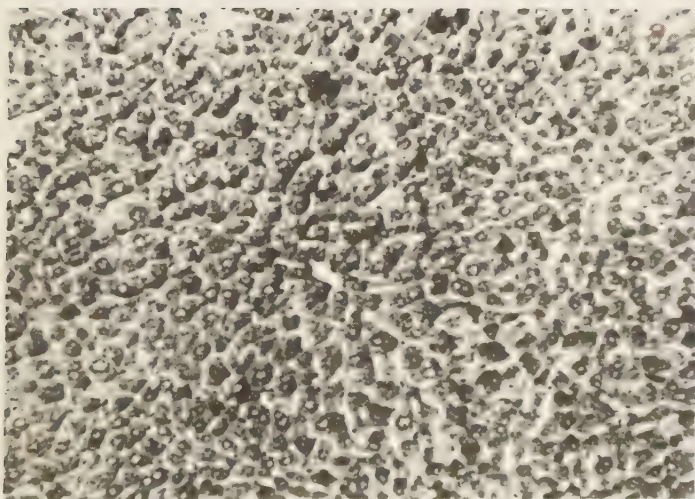


Abb. 6
22 Tage
nach Absetzen
des Phenobar-
bitals

IV. Cytologische Änderungen während Phenobarbitalapplika- tion und im Reversionsstadium

1. Parenchym

a Gesamtzellzahlen pro Flächeneinheit.

Die Leberzellzahl pro 1000 Gesichtsfelder ohne Auswahl (Zelldichte) verhält sich umgekehrt proportional zu dem der relativen Lebergewichte (s. Abb. 1 und Tab. 1). Während des stärksten Anstieges der relativen Lebergewichte fällt die Leberzellzahl am ausgeprägtesten ab. Bereits einen Tag nach Phenobarbitalverabfolgung ist ein signifikantes Absinken der Leberzellzahlen auf 14864, (bei den Kontrollen 16932) zu ermitteln. Wie bei den relativen Lebergewichten folgt aber hier die weitere Veränderung dann langsamer. Am 15. Tag werden die niedrigsten Werte von 10928 registriert.

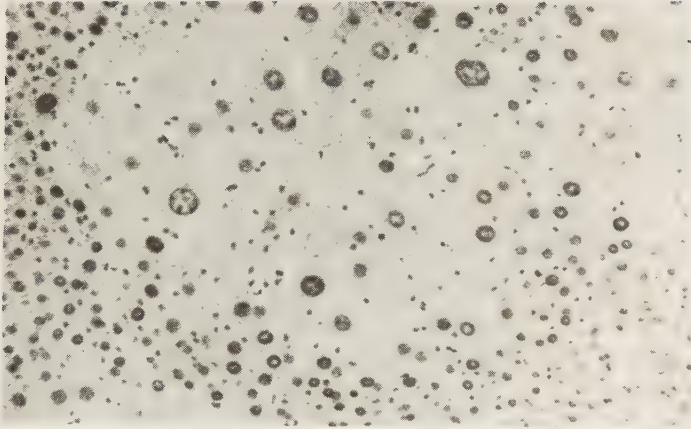
Abb. 2, 3 und 4 lassen die Abnahme der Zelldichte deutlich erkennen.

Nach Absetzen der Substanz bildet sich die Vergrößerung der Leberzellen zurück und es kommt wieder zu einem Anstieg der Zelldichte. (Abb. 5 und 6)

In den ersten Tagen nach Absetzen von Phenobarbital geht die Verkleinerung der Zellen sehr rasch vor sich.

Bereits nach 2 1/2 Tagen ist die Leberzellzahl auf den Wert von 13440 angestiegen, nach 5 Tagen erreicht sie 14928. Die starke Leberzellvergrößerung unter Phenobarbital-einwirkung ist also äusserst rasch reversibel. Die vollständige Rückbildung ist jedoch erst 22 Tage nach Absetzen der Substanz abgeschlossen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Leberzellzahlen im Bereich der Kontrollen angekommen. (Tab. 1, Abb. 1)

Abb. 7
30 Wochen
Phenobarbi-
tal



Ein Vergleich der Leberzellldichte nach 15 Tagen Phenobarbital mit den Werten von 18 und 30 Wochen behandelten Tieren (s. Abb. 4 und 7) ergibt, daß sich die Leberzellzahlen nach 15 Tagen nicht mehr wesentlich vermindern. Die Werte nach 18 und 30 Wochen liegen nur gering unter denen der 15 Tage Tiere (Tab. 1, Seite 2), eine statistische Signifikanz zwischen Kurz- und Langzeitbehandlung ist nicht vorhanden ($p > 0,05$).

2. Anzahl der Doppelkernigen pro Flächeneinheit

Die absolute Zahl der Doppelkernigen und Mehrkernigen Leberzellen pro 1000 Gesichtsfelder liegt bei den Kontrolltieren um 4000, das entspricht einem Prozentsatz von 21,4% der gezählten Leberzellen. Im Verlauf der Phenobarbitalverabfolgung sinkt die Anzahl der Doppelkernigen nach 15 Tagen auf 1720: bezogen auf die Gesamtzellzahl der Leber entspricht dies einem Prozentsatz von 15,7. Betrachten wir die einzelnen Werte, so finden wir nach Phenobarbitalzufuhr folgende Prozentsätze:

1 Tag	20,1%
2 Tage	19,6%
5 Tage	17,6%
10 Tage	17,0%
15 Tage	15,7%
2 Tage nach Absetzen von Phenobarbital	17,0%
5 Tage nach Absetzen von Phenobarbital	19,0%

Diese Werte zeigen, daß die relative Anzahl der Doppelkernigen während der Phenobarbitalapplikation stärker absinkt als die der Einkernigen. Es liegt also eine unproportionierte Reduzierung der Doppelkernigen vor.

Nach Absetzen des Präparates kommt es wieder zu einem sehr schnellen Anstieg der Doppelkernigen mit Absolutzahlen von 2315 nach 2 1/2 Tagen entsprechend 17% der Gesamtzellzahl. Nach 5 Tagen liegt der Wert bei 2820 absolut bzw. 19% relativ. Der weitere Anstieg der Doppelkernigen geht dann allmählicher vor sich. Die Ausgangswerte sind allerdings schon nach 8 Tagen wieder annähernd erreicht. (Tab.1, Seite 2 und Abb.1)

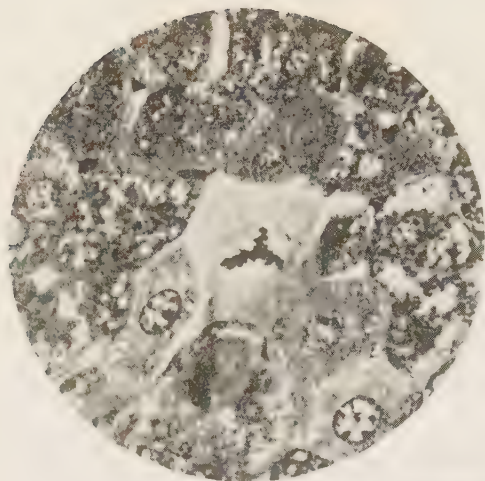


Abb. 8

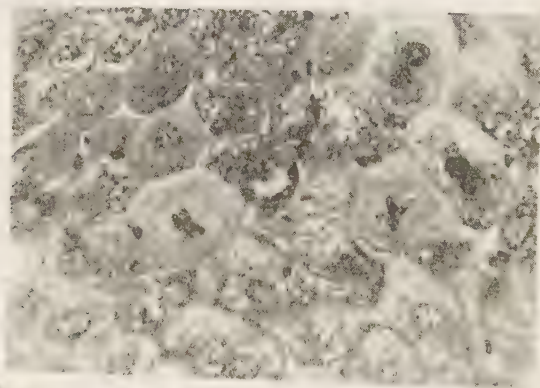


Abb. 9

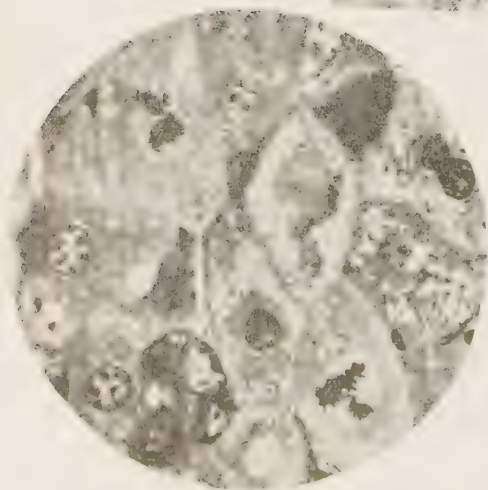


Abb. 10

Atypische Mitosen
unter Phenobarbital-
einwirkung

c Mitose-Index

Wie die Untersuchung zeigte, steigt die Mitoserate nach Phenobarbitalapplikation anfangs rasch an. Der Mitose-Index ist nach dem 1.Tag mit 0,067% bereits signifikant gegenüber den Kontrollen.erhöht. (Abb.1 und Tab.1, Seite 3)

Nach 2 Tagen Phenobarbital erreicht der Mitose-Index seinen Höchstwert von 0,125%, danach sinkt die Mitosehäufigkeit wieder ab und ist nach 10 Tagen im Bereich der Kontrollen. Das Absetzen des Phenobarbitals hat auf die Mitoserate keinen Einfluß. Sie bleibt gleichbleibend niedrig. Bemerkenswert ist aber das gehäufte Auftreten von atypischen Mitosen . (Abb.8,9 und 10)

d Nekrose-Index

Beim orientierenden Betrachten der Präparate waren zahlreiche Einzellzellnekrosen aufgefallen (Abb.11). Die vergleichende quantitative Auswertung der Nekrosehäufigkeit zeigt, daß es bei Beginn der Phenobarbitalapplikation zu einem vermehrten Zellzerfall kommt, der für die Dauer der Phenobarbitalapplikation anhält. Wie auf Tab.1, Seite 3 und Abb.1 ersichtlich, liegt das Maximum des Nekrose-Index mit 0,235% bei 48-stündiger Applikation. Später geht er wieder zurück, erreicht jedoch erst nach Absetzen des Phenobarbitals wieder Normalwerte. Auch in den ausgewerteten Präparaten der 18 und 30 Monate lang mit Phenobarbital behandelten Tiere sind gegenüber der Kontrolle signifikant höhere Nekroseindices gefunden worden. Die Nekrosen treten gehäuft im Intermediärraum und selten in der Läppchenperipherie und im Zentrum auf.

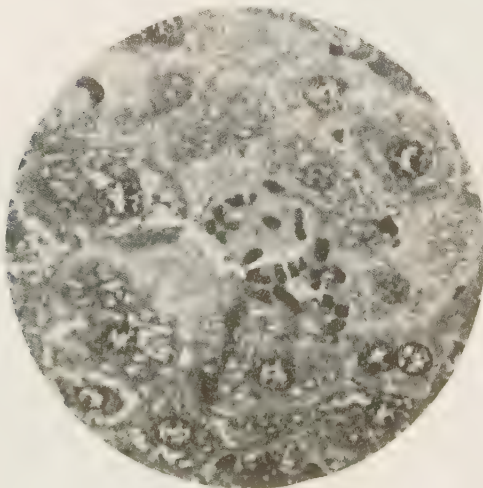


Abb. 11
Einzellzellnekrose
unter
Phenobarbital

e Fusions-Index

Bei der Durchmusterung der Präparate fielen neben Einzelzellnekrosen auch atypische, längliche, hantelförmige Kernformen auf (Abb.12). Weiterhin waren dicht zusammenliegende Kerne bemerkbar, deren Kernmembran aufgelockert erschien, (Abb.13). Hierbei könnte es sich um eine Verschmelzung von Kernen und Zellen handeln. Obwohl wir den endgültigen Beweis dafür mit der angewandten Methode nicht erbringen konnten, wählten wir den Ausdruck Fusionen. Die Fusionsfiguren liegen vorwiegend im Zentrum und Intermediärraum der Leberläppchen.

Für eine Kernverschmelzung könnte auch die Tatsache sprechen, daß die Leberpräparate im Verlauf der Phenobarbitalapplikation eine nicht mehr nur numerische, sondern auch prozentuale Verminderung der Doppelkernigen aufweisen. Der prozentuale Anteil der Doppelkernigen ist mit 20,4% bei den Kontrollpräparaten am höchsten und mit 15,9% bei den 15 Tage mit Phenobarbital behandelten Tieren am geringsten. Die Fusionsfiguren in den Präparaten steigen im Verlauf der Phenobarbitalbehandlung gegenüber den Kontrollen innerhalb von 2 Tagen auf ihr Maximum von 0,3% an, um bis zum Behandlungsende auf 0,11% abzufallen. (Tab.1, Seite 3 und Abb.1) Die Werte sind aber immer noch signifikant höher als bei den Kontrollen (0,008%). Auffallend ist aber im Gegensatz zur Mitose- und Nekroserate, daß es nach Absetzen der Substanz nochmals zu einem sprunghaften Anstieg der atypischen Kernformen (Langkernige) kommt, d.h. in diesem Fall dürfte man wohl für den Reversionsvorgang eine amitotische Kernteilung annehmen, die in äusserst kurzer

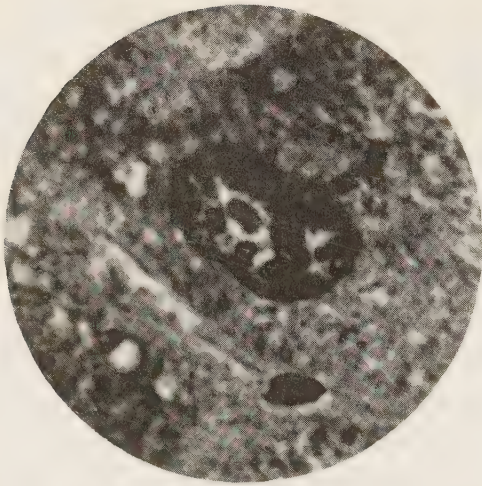


Abb. 12
Atypische
Kernformen
(langkernige)

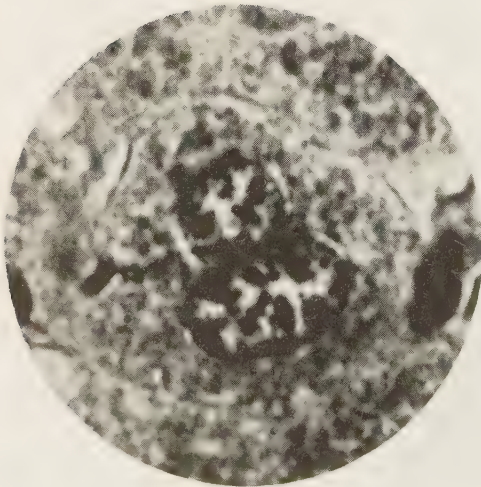


Abb. 13
dicht zusammen-
liegende Kerne
mit aufgelocker-
ter Kernmembran

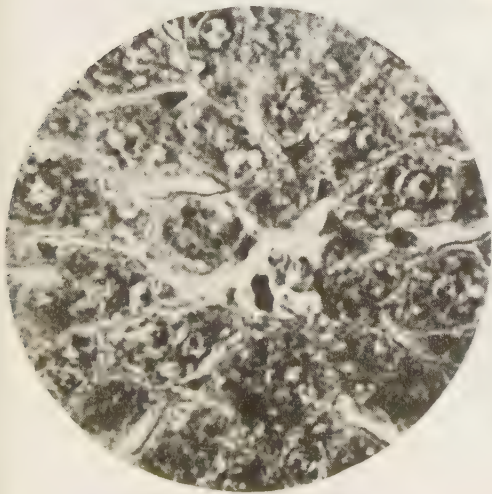
Zeit vor sich geht. Dafür würde auch sprechen, daß die Zahl der Kernteilungsfiguren kontrollgleich bleibt, also keine mitotische Zellvermehrung stattfindet. Auch noch bei 5, 8, 12 und 22 Tagen nach Absetzen des Phenobarbitals sind die Werte signifikant höher als bei den Kontrollen. Erst nach 50 Tagen findet sich wieder ein normaler Fusions-Index.

1. Differenzierung des Leberläppchens nach der Zellzahl

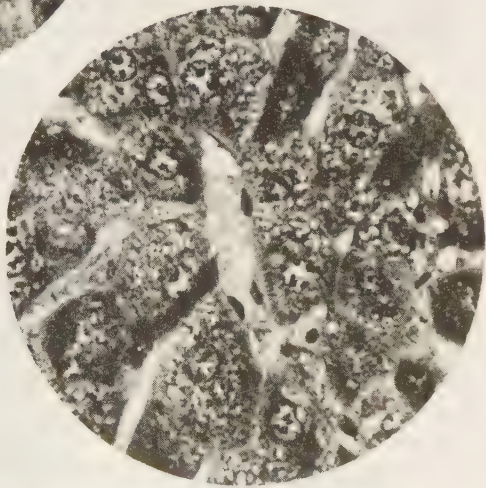
Bei grob orientierender Betrachtung der Präparate fiel auf, daß die Zellvergrößerung in manchen Bezirken sehr ausgeprägt, in anderen Bezirken dagegen kaum zu erkennen war. Im Läppchenzentrum fand sie sich am stärksten ausgeprägt, während in der Läppchenperipherie die Zellgröße nicht verändert schien. Um eine genaue Aussage über die Unterschiede des Einzelzellvolumens der 3 Läppchenbezirke machen zu können, wurden die Zellzahlen in den einzelnen Zonen getrennt analysiert. Es zeigte sich, daß die Zellzahlabnahme besonders rasch und intensiv im Läppchenzentrum erfolgte, daß also die Größenzunahme der Zellen dort am ausgeprägtesten ist. (s. Tab. 2 und Aob. 1) Dabei ergibt sich die stärkste Zellzahlabnahme des Läppchenzentrums zu Beginn der Phenobarbitalapplikation: von Werten um 165 bei den Kontrolltieren auf Werte von ca. 113 nach 2 Tagen. Die spätere Abnahme der Zellzahl pro Fläche geht wesentlich langsamer vor sich. Nach 15 Tagen werden die niedrigsten Werte mit 96 Zellen pro 10 Gesichtsfelder gezählt. In Abb. 4 sind 3 Ausschnitte aus Läppchenzentren von Kontrolltieren 8 und 10 Tagen mit Phenobarbital behandelten Tieren gegenübergestellt, die einen optischen Eindruck von der Zellvergrößerung im Zentrum vermitteln.

Im Läppchenzentrum geht nach Absetzen der Substanz die Verkleinerung der Zellen, d.h. die Zunahme der Zellzahl langsamer als in den übrigen Zonen. 2 Tage nach Absetzen der Substanz betrug die Zellzahl mit 97 pro Gesichtsfeldern fast gleich dem 5 Tagewert. 5 Tage nach Absetzen ist

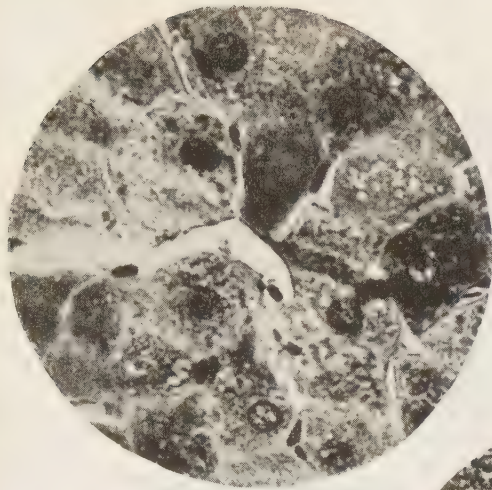
Abb. 14
Läppchenzentrum



Kontrollen



5 Tage Phenobarbital



15 Tage Phenobarbital

Abb. 15

Läppchenzentrum
12 Tage nach Absetzen
des Phenobarbitals

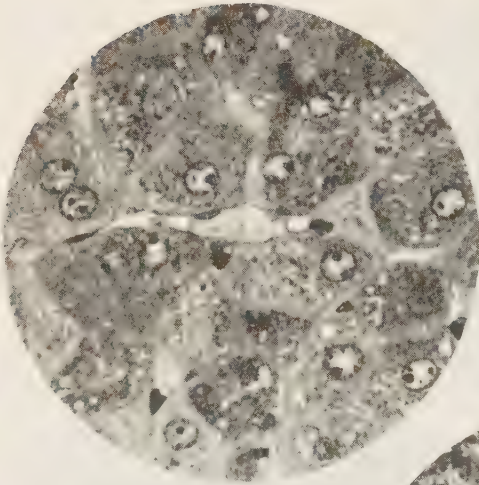


Abb. 15
Läppchenzentrum
22 Tage nach
Phenobarbital-
Entzug

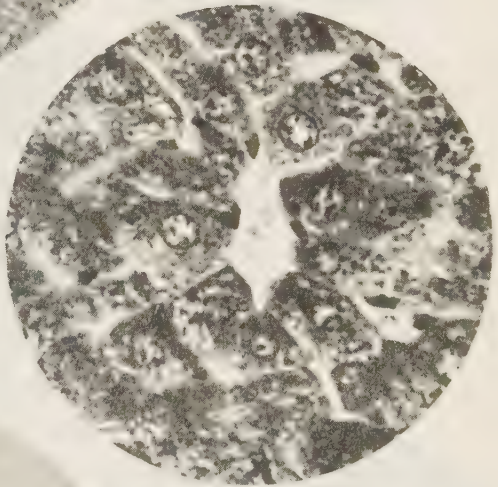
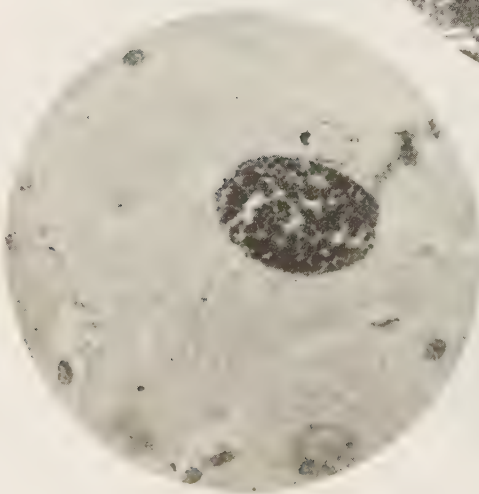


Abb. 16
Läppchenzentrum
mit maximal vergrößerten
Kernen und Zellen nach
30 wöchiger Behandlung
mit Phenobarbital



immer noch kein signifikanter Unterschied gegenüber den 15 Tagewerten festzustellen. Erst 12 Tage nach Phenobarbitalentzug kommt es mit einem Wert von 137 zu einem signifikanten Unterschied gegenüber 15 Tagen. (s. Abb. 15)

Während die Werte 22 Tage nach Phenobarbitalentzug immer noch signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren sind, rücken sie nach 50 Tagen schließlich in den Kontrollbereich.

Ähnlich sind die Zählergebnisse im Intermediärraum der Leberläppchen. Nur ist hier die Zellvergrößerung nicht so ausgeprägt und die Zellzahlminderung pro Fläche dementsprechend geringer. Die niedrigsten Werte finden sich wieder nach 10 bzw. 15 Tagen Applikation von Phenobarbital. Nach Absetzen des Phenobarbitals erfolgt der Anstieg der Zellzahlen in den Bereich der Kontrollen im Intermediärraum auch früher als im Zentrum. Bereits nach 12 Tagen ist der Unterschied zwischen Kontrollen und Phenobarbitaltieren aufgehoben.

Bei den 18 und 30 Wochen unter Phenobarbitaleinwirkung stehenden Tieren ist die Zellhypertrophie im zentralen Bereich der Leberläppchen noch ausgeprägter als bei 15 Tagen Phenobarbitaleinwirkung. Mit Zellzahlwerten von 60 bzw. 62 pro 10 Gesichtsfeldern sind diese noch etwa um ein Drittel kleiner. (Abb. 16)

In der Läppchenperipherie bleiben die Zellzahlen unter Phenobarbital gleich, es tritt also keine Veränderung der Zellgröße ein.

Die Anzahl der Doppelkernigen nimmt in den zentralen Läppchenbezirken stark ab und zwar ist die Abnahme wesentlich stärker als die Abnahme der Gesamtzellzahl, also unproportioniert. Von einem Wert um 44 bei den unbehandelten Tieren fällt er auf 11,8. Der prozentuale Anteil der Doppelkernigen beträgt bei den Kontrollen 27%, nach 15 Tagen Phenobarbital nur noch 11,1%. In der Reversionsphase kommt es wiederum sowohl zu einer absoluten, als auch zu einer prozentualen Zunahme der Doppelkernigen. Der Ausgangswert der Kontrollen ist nach 12 Tagen Phenobarbitalentzug wieder erreicht.

In der Intermediärzone vermindert sich die Zahl der Doppelkernigen ebenfalls. Der prozentuale Anteil geht von 29% (Kontrolle) auf 14% (15 Tage) zurück. Nach Applikationsende erfolgt der Wiederanstieg langsamer: nach 12 Tagen sind wieder normale Werte (25,9%) erreicht. In der Läppchenperipherie bleibt die Anzahl der Doppelkernigen während und nach der Phenobarbitalbehandlung nahezu gleich.

2. Extraparenchym

Unter Einwirkung des Phenobarbitals treten auch im Extraparenchym Veränderungen der Zählergebnisse auf. Die Endothelzelldichte, die bei den Kontrollen 16784 beträgt, nimmt anfangs ab und erreicht 5 Tage nach Beginn der Behandlung einen Minimalwert von 14908 Zellen pro Flächeneinheit. Dann steigt die Bindegewebszellzahl wieder an und erreicht bei Behandlungsende einen nahe den Kontrollen gelegenen Wert. Nach Abbruch der Behandlung steigt die Bindegewebszahl noch kurze Zeit an, um am 2. phenobarbitalfreien Tag wieder im Kontrollbereich zu liegen.

Aus der prozentualen Relation der Extraparenchymzellen zu den Parenchymzellen (Extraparenchym-Index) wird eine echte und signifikante, im Zentrum des Leberläppchens mit der Parenchymzellvergrößerung einhergehende Vermehrung ersichtlich. (Abb.15) Nach Wegfall des Agens geht die Extraparenchymzellzahl allmählich wieder auf den Ausgangswert zurück, den sie im Vergleich mit den Parenchymzellen deutlich verlangsamt erst am 12. substanzfreien Tag erreicht hat.

Nach 18 und 30 Wochen ist die Zellvermehrung gegenüber den 15 Tage Tieren noch verstärkt. Sie findet aber parallel mit der Leberzellvergrößerung immer nur im zentralen und intermediären Läppchenbereich statt.

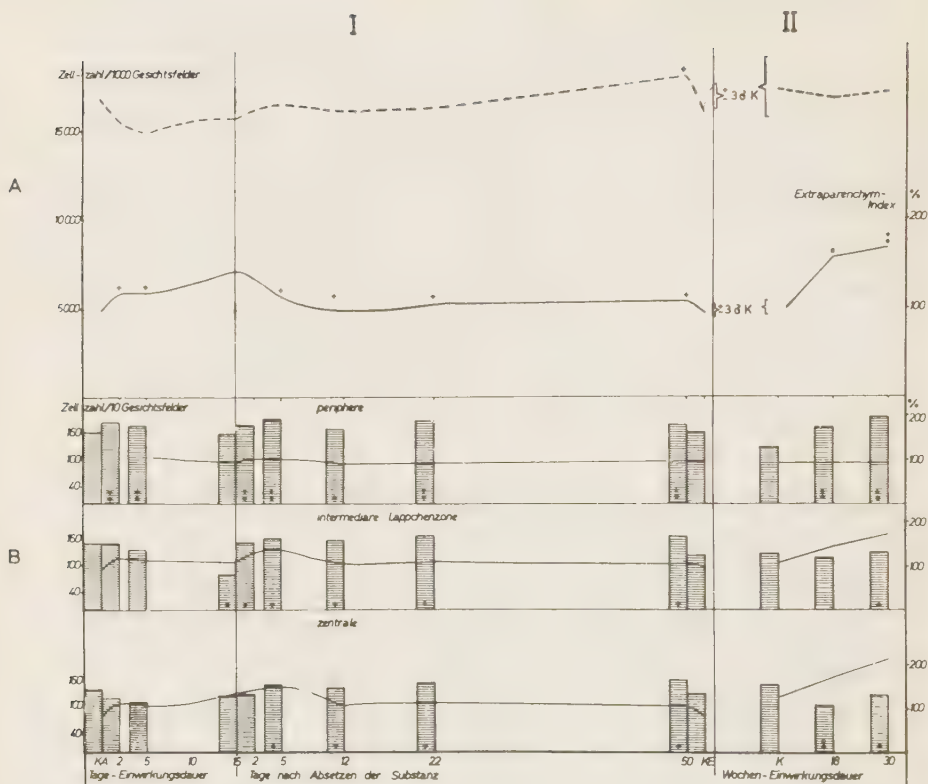


Abbildung 17

Zellichte im Extraparenchym der Leber unter der Einwirkung von Phenobarbital-Na.

I Zählergebnisse aus der Leber der Maus (♂) während 15-tägiger Behandlung und in der substanzfreien Nachphase.

II Zählergebnisse nach 18- und 30-wöchiger Behandlung.

A Extraparenchymzellichte und deren prozentualer Anteil an der Parenchymzellichte = Extraparenchym-Index (ausgezogene Kurve).

B Analyse der Parenchymzellichte in den einzelnen Lappchenzonen mit Extraparenchym-Index (ausgezogene Kurve).

• Signifikanz gegenüber der Kontrolle

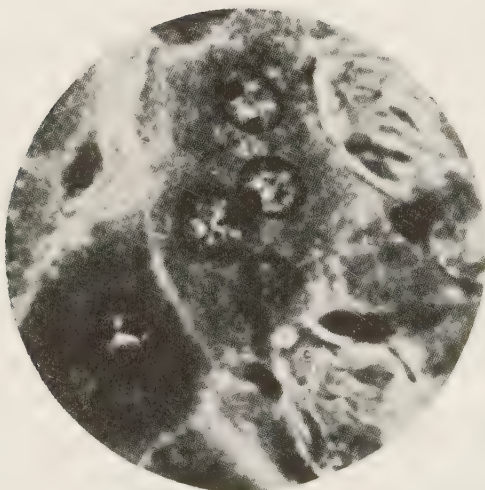
+ Signifikanz gegenüber dem 15 Tage-Wert.

C Diskussion

In unseren Versuchen zeigte sich unter Phenobarbital (15Tage) eine Reduzierung der relativen Zelldichte im Läppchenzentrum und Intermediärzone. Die durch Phenobarbital induzierte Lebervergrößerung beruht demnach vorwiegend auf einer im Läppchenzentrum und Intermediärraum sich abspielenden Hypertrophie der Einzellzellen des Parenchyms, während in der Peripherie keine Größenzunahme festzustellen ist. Auch bei extrem langer Substanzapplikation (10 und 30 Wochen) blieb die Zellvergrößerung auf den Zentral- und Intermediär- raum beschränkt.

An der Verminderung der Zelldichte sind die Doppelkernigen durch unproportionierte Abnahme in starkem Umfang beteiligt. Während des Initialstadiums werden im Leberparenchym verschiedene, in typischer Reihenfolge ablaufende morphologische Besonderheiten registriert, die zur Erklärung der Entstehung der Hypertrophie beitragen: es tritt eine Kernteilungsphase auf, die sich nach 48-stündiger Substanzapplikation in einem Maximum des Mitose-Index äussert. Die Bedeutung der dabei gehäuft beobachteten atypischen Mitoseformen ist mit den angewandten Untersuchungsmethoden nicht zu erklären. In Verbindung mit gleichzeitig in der Intermediärzone gehäuft auftretenden Einzellzellnekrosen ist aber insgesamt auf einen erhöhten Zellumsatz zu schließen. Da sowohl Mitose-, als auch Nekrosehäufigkeit besonders in den ersten 5 Tagen ansteigen, ist anzunehmen, daß das Pheno- barbital besonders intensiv in den ersten Tagen den Zellumsatz erhöht.

Abb. 18



mehrkernige Zellen
nach Absetzen des
Phenobarbitals

Auffällige Kernformen nach Substanzapplikation (Kurz- und Langzeit) in Form von hantel- und sanduhrförmigen Kernen müssen auf Grund der unproportionierten Abnahme der Doppelkerne als Kernfusionen interpretiert und damit als besondere Form der Polyploidisierung bezeichnet werden. Wie frühere Markierungsversuche mit H^3 -Thymidin (Dissertation NIESSING) gezeigt haben, findet unter Phenobarbital um den 5. Behandlungstag eine erhebliche DNS-Synthese-steigerung statt, die aber keine Vermehrung der Mitoserate zur Folge hat. Daraus ist zu schließen, daß es in dieser Zeit zu erheblicher Polyploidisierung kommt.

Nach Absetzen des Agens beginnt die Reversion sofort und verläuft sehr rasch. Bereits innerhalb der ersten 5 Tage ist eine weitgehende Rückbildung der substanzinduzierten Veränderungen eingetreten. Die weitere Reversion erfolgt langsamer. 3 Wochen nach Absetzen des Präparates ist sie weitgehend abgeschlossen. Die Zellzahlen und Zellgrößen entsprechen dann wieder der Norm. Für die plötzlich wieder zunehmende Zelldichte und die Verkleinerung der Zellen dürften Zellteilungen verantwortlich sein. Es lassen sich jedoch histologisch keine mitotischen Teilungsbilder nachweisen. Dagegen findet man einen sprunghaften Anstieg der sanduhr- und hantelförmigen Kerne. Weiter fallen auch mehrkernige Zellen auf. (Abb. 18) Dies sind Hinweise für eine amitotische Vermehrung. BUCHER 1959 und GRUNDMANN 1964 haben gezeigt, daß insbesondere bei Malignomen und in regenerierenden Organen amitotische Teilungen möglich sind. In unserm Fall könnte nach Wegfall des Agens ein solcher

Teilungsmodus angenommen werden. Daß ein solcher Teilungsmechanismus grundsätzlich möglich ist, zeigen elektronenmikroskopische Untersuchungen von PEHLEMANN (1968), der Amitosen bei ACTH induzierter Zellvermehrung in der Nebenniere von *Rana temporaria* nachgewiesen hat.

Im Extraparenchym tritt eine prozentuale und numerische Zunahme der Endothelzellen ein. Es dürfte sich um eine Ausdehnung des Kapillarnetzes als Folge der Vergrößerung des gesamten Hepatons handeln.

Nach Absetzen geht die Abnahme der Endothelzellen d.h. die Rückbildung des Kapillarnetzes offensichtlich wesentlich langsamer vor sich, als die Verkleinerung des Hepatons durch Reversion der Parenchym- und Zellhypertrophie.

D Zusammenfassung

1. An der Leber weißer Mäuse wurde das durch Phenobarbital induzierte Wachstum und die Reversibilität der eingetretenen Veränderungen mit histologischen Methoden untersucht.
2. Innerhalb 5 Tagen kommt es zu einer starken Lebervergrößerung durch Hypertrophie der Leberzellen im Läppchenzentrum und im Intermediärraum.
3. Während des Initialstadiums findet im Intermediärraum ein vermehrter Zellumsatz (Mitosen und Einzelzellnekrosen) statt.
4. In den ersten Tagen der Substanzanwendung erfolgt die Zellvergrößerung im Zentrum des Leberläppchens wahrscheinlich durch Polyploidisierung, später (18 und 30 Wochen) bevorzugt durch Kernfusion.
5. Nach Absetzen des Agens vollzieht sich eine Reversion der eingetretenen Veränderungen, zum größten Teil bereits innerhalb der ersten 5 Tage. Nach 22 Tagen ist sie abgeschlossen.
6. In der Phase der Reversion treten vermehrt hantel- und sanduhrförmige Kerne auf, während Mitosefiguren fehlen, so daß man für die größere Zelldichte nach Absetzen des Präparates amitotische Zellteilungen annehmen muß.
7. Im Extraparenchym findet eine Zellvermehrung unter Phenobarbitaleinfluß besonders im Läppchenzentrum und im Intermediärraum statt, die als Wachstum des Kapillarnetzes interpretiert wird. Sie ist langsamer reversibel, als die Parenchymveränderungen.

Tabellarische Zusammenstellung der Mittelwerte
 der einzelnen Tiergruppen mit den jeweiligen
 Signifikanzwerten gegenüber der Kontrollgruppe
 und gegenüber den 15 Tage lang unter Phenobarbital-
 Einwirkung stehenden Tieren:

Erläuterungen der Abkürzungen :

KG = Körpergewicht
 LG = Lebergewicht
 pK = p gegenüber den Kontrollen
 p15 = p gegenüber der 15 Tage lang mit Phenobarbital-Na
 behandelten Tiergruppe
 Par.Zz. = Parenchymzellzahl
 Doppelk. = Doppelkernige
 Extra Par. = Extraparenchymzellen
 KA = Anfangskontrollgruppe
 Ph1 = 1 Tag unter Phenobarbital-Wirkung stehende Tiergruppe
 Ph2 = 2 Tage - " -
 Ph5 = 5 - " -
 Ph10 = 10 - " -
 Ph15 = 15 - " -
 Ph15a1,5 = Tiergruppe 1,5 Tage nach Absetzen des Phenobarbitals
 Ph15a2,5 = " 2,5" - " -
 Ph15a5 = " 5 - " -
 Ph15a8 = " 8 - " -
 Ph15a12 = " 12 - " -
 Ph15a22 = " 22 - " -
 Ph15a50 = " 50 - " -
 KE = Endkontrollgruppe
 Kalt = alte Kontrollgruppe stehende
 Ph18wo = 18 Wochen unter Phenobarbitaleinwirkung Tiergruppe
 Ph30wo = 30 Wochen unter Phenobarbitaleinwirkung stehende
 Tiergruppe

Tabelle I: Seite 1

	KG in g	abs.LG in mg	rel.LG	p K p 15
K _A	39,00 ±1,66	1970 ±116	51,18 ±1,04	0,001
Ph1	39,80 ±2,31	2198 ±119	55,34 ±0,98	< 0,05 < 0,001
Ph2	41,75 ±2,26	2730 ±215	65,05 ±2,24	< 0,001 < 0,001
Ph5	34,30 ±1,51	2548 ±120	74,32 ±1,73	< 0,001 < 0,001
Ph10	35,14 ±0,88	3060 ± 89	87,46 ±1,32	< 0,001 < 0,05
Ph15	30,28 ±0,91	2976 ±223	96,20 ±3,17	< 0,001
Ph15a1,5	37,13 ±1,39	3213 ±146	87,13 ±1,69	< 0,001 < 0,05
Ph15a2,5	36,85 ±1,76	2695 ±139	73,18 ±1,51	< 0,001 < 0,001
Ph15a5	34,92 ±0,94	2204 ± 57	63,26 ±2,24	< 0,01 < 0,001
Ph15a8	36,28 ±1,71	2106 ±119	58,12 ±1,34	< 0,01 < 0,001
Ph15a12	35,02 ±2,15	1908 ±141	54,28 ±1,52	> 0,05 < 0,001
Ph15a22	39,26 ±0,33	2156 ± 30	54,98 ±0,76	< 0,05 < 0,001
Ph15a50	39,04 ±0,63	2014 ± 20	51,70 ±0,66	> 0,05 < 0,001
K _E	35,08 ±1,73	1844 ±138	52,54 ±1,33	> 0,05 < 0,001
K _{alt}	40,40 ±1,01	1990 ± 78	49,20 ±0,81	< 0,001
Ph18Wo	40,00 ±1,50	3265 ±268	81,80 ±6,95	< 0,001 > 0,05
Ph30Wo	43,80 ±0,60	3596 ±246	82,00 ±5,17	< 0,001 > 0,05

Tabelle I: Seite 2

Par.Zz. (1000GF)	p K p 15	Doppelk. (1000GF)	p K	Extrapar.Zz. (1000GF)	p K p 15
16932 ± 539	< 0,001	3628 ±125	< 0,001	16784 ± 279	< 0,05
14864 ± 292	< 0,01 < 0,001	3012 ±121	< 0,01 < 0,001	16600 ± 192	> 0,05 < 0,05
13390 ± 812	< 0,01 < 0,02	2625 ±219	< 0,01 < 0,01	15640 ± 585	> 0,05 > 0,05
12840 ± 520	< 0,001 < 0,02	2392 ±167	< 0,001 < 0,01	14908 ± 281	< 0,01 > 0,05
12084 ± 245	< 0,001 < 0,02	2176 ±192	< 0,001 > 0,05	15612 ± 258	< 0,02 > 0,05
10928 ± 293	< 0,001	1720 ± 96	< 0,001	15724 ± 355	< 0,05
11082 ± 344	< 0,001 > 0,05	1741 ±124	< 0,001 > 0,05	15932 ± 417	< 0,05 > 0,05
13440 ± 336	< 0,01 < 0,001	2315 ± 72	< 0,001 < 0,01	16020 ± 388	> 0,05 > 0,05
14660 ± 359	< 0,02 < 0,001	2820 ±172	< 0,01 < 0,001	16480 ± 438	> 0,05 > 0,05
15404 ± 196	< 0,05 < 0,001	3224 ±380	> 0,05 < 0,01	16128 ± 394	> 0,05 > 0,05
15600 ± 436	> 0,05 < 0,001	3276 ±428	> 0,05 < 0,01	15384 ± 396	< 0,05 > 0,05
15628 ± 597	> 0,05 < 0,001	3360 ±187	> 0,05 < 0,001	16280 ± 249	> 0,05 > 0,05
16624 ± 274	> 0,05 < 0,001	4080 ±132	< 0,05 < 0,001	17960 ± 425	> 0,05 < 0,05
16540 ± 466	> 0,05 < 0,001	4316 ±486	> 0,05 < 0,001	15864 ± 260	< 0,05 > 0,05
16035 ± 357	> 0,05 < 0,001	4475 ± 95	< 0,001 < 0,001	17180 ± 557	> 0,05 < 0,05
10630 ± 205	< 0,001 > 0,05	2125 ±158	< 0,001 > 0,05	16665 ± 342	> 0,05 > 0,05
10198 ± 138	< 0,001 > 0,05	2220 ± 75	< 0,001 > 0,01	17052 ± 444	> 0,05 < 0,05

Tabelle I: Seite 3

Mitose Index	p K p 15	Nekrose Index	p K p 15	Fusions Index	p K p 15
0,030 ±0,024	> 0,05	0,008 ±0,002	< 0,05	0,008 ±0,003	< 0,05
0,067 ±0,027	> 0,05 > 0,05	0,044 ±0,011	< 0,02 > 0,05	0,070 ±0,026	< 0,05 > 0,05
0,125 ±0,025	< 0,05 < 0,01	0,239 ±0,066	< 0,01 < 0,05	0,300 ±0,086	< 0,01 < 0,05
0,056 ±0,033	> 0,05 > 0,05	0,168 ±0,061	< 0,05 > 0,05	0,273 ±0,081	< 0,02 < 0,05
0,008 ±0,005	> 0,05 > 0,05	0,053 ±0,021	< 0,05 > 0,05	0,269 ±0,052	< 0,01 < 0,05
0,022 ± 0,009	> 0,05 > 0,05	0,107 ±0,034	< 0,05 > 0,05	0,114 ±0,026	< 0,01
0,005 ±0,005	> 0,05 > 0,05	0,042 ±0,021	< 0,05 > 0,05	0,132 ±0,024	< 0,001 < 0,05
0,002 ±0,002	> 0,05 > 0,05	0,012 ±0,006	> 0,05 > 0,05	0,220 ±0,018	< 0,001 < 0,01
0,001 ±0,001	> 0,05 > 0,05	0,009 ±0,009	> 0,05 > 0,05	0,087 ±0,021	< 0,01 > 0,05
0,000 ±0,000	> 0,05 > 0,05	0,001 ±0,001	> 0,05 > 0,02	0,085 ±0,018	< 0,01 > 0,05
0,000 ±0,000	> 0,05 > 0,05	0,000 ±0,000	> 0,02 > 0,02	0,045 ±0,015	< 0,05 < 0,05
0,000 ±0,000	> 0,05 > 0,05	0,011 ±0,007	> 0,05 > 0,05	0,048 ±0,015	> 0,05 < 0,05
0,001 ±0,001	> 0,05 > 0,05	0,004 ±0,002	> 0,05 > 0,05	0,012 ±0,004	> 0,05 < 0,01
0,008 ±0,007	> 0,05 > 0,05	0,018 ±0,012	> 0,05 > 0,05	0,000 ±0,000	> 0,05 < 0,01
0,005 ±0,003	> 0,05 > 0,05	0,005 ±0,003	> 0,05 > 0,05	0,000 ±0,000	> 0,05 < 0,01
0,002 ±0,002	> 0,05 > 0,05	0,051 ±0,009	< 0,01 > 0,05	0,063 ±0,017	< 0,01 > 0,05
0,000 ±0,000	> 0,05 > 0,05	0,071 ±0,017	< 0,01 > 0,05	0,029 ±0,010	< 0,02 > 0,05

Tabelle II: Zellzahl/10 Gesichtsfelder in den einzelnen Lappchenzonen

	zentral $\frac{pK}{p15}$	intermed. $\frac{pK}{p15}$	peripher $\frac{pK}{p15}$
K_A	165,00 $\pm 6,09 <0,001$	162,2 $\pm 3,9 <0,001$	182,4 $\pm 7,9 >0,05$
Ph2	113,25 $<0,01$ $\pm 8,93 >0,05$	129,3 $<0,01$ $\pm 8,4 >0,05$	180,5 $>0,05$ $\pm 20,7 >0,05$
Ph5	110,20 $<0,001$ $\pm 4,36 >0,05$	123,2 $<0,001$ $\pm 2,3 >0,05$	168,8 $>0,05$ $\pm 5,6 >0,05$
Ph15	96,20 $<0,001$ $\pm 3,79$	112,2 $<0,001$ $\pm 4,6$	169,2 $>0,05$ $\pm 2,9$
Ph15a2,5	97,50 $<0,001$ $\pm 3,88 >0,05$	118,0 $<0,01$ $\pm 9,1 >0,05$	173,5 $>0,05$ $\pm 5,9 >0,05$
Ph15a5	104,8 $<0,001$ $\pm 5,51 >0,05$	120,4 $<0,01$ $\pm 8,5 >0,05$	186,8 $>0,05$ $\pm 6,0 >0,05$
Ph15a12	137,4 $<0,05$ $\pm 7,14 <0,001$	153,0 $>0,05$ $\pm 6,6 <0,001$	183,2 $>0,05$ $\pm 11,1 >0,05$
Ph15a22	138,8 $<0,02$ $\pm 5,36 <0,001$	155,6 $>0,05$ $\pm 6,5 <0,001$	200,4 $>0,05$ $\pm 14,5 >0,05$
Ph15a50	160,8 $>0,05$ $\pm 3,46 <0,001$	161,6 $>0,05$ $\pm 2,5 <0,001$	190,8 $>0,05$ $\pm 5,6 >0,01$
K_{alt}	123,25 $<0,01$ $\pm 5,34 <0,01$	135,7 $<0,01$ $\pm 5,9 <0,02$	160,5 $>0,05$ $\pm 2,9 >0,05$
Ph18Wo	63,5 $<0,001$ $\pm 5,42 <0,001$	97,5 $<0,001$ $\pm 5,1 <0,01$	187,0 $>0,05$ $\pm 7,2 >0,05$
Ph30Wo	62,2 $<0,001$ $\pm 4,44 <0,001$	90,5 $<0,001$ $\pm 2,8 >0,005$	211,4 $>0,05$ $\pm 7,7 >0,05$

Tabelle III: Doppelkernige/10 Gesichtsfelder in den Läppchenzonen

	zentral	pK p15	intermed.	pK p15	peripher
K_A	44,00 $\pm 3,90$	$<0,001$	47,2 $\pm 7,4$	$<0,001$	47,8 $\pm 4,2$
Ph2	30,25 $\pm 3,63$	$<0,001$ $<0,05$	35,5 $\pm 2,9$	$>0,05$ $<0,001$	43,8 $\pm 4,0$
Ph5	24,4 $\pm 1,6$	$<0,001$ $<0,05$	27,0 $\pm 1,7$	$<0,001$ $<0,05$	43,4 $\pm 3,8$
Ph15	11,8 $\pm 0,9$	$<0,001$	15,8 $\pm 0,8$	$<0,001$	41,00 $\pm 1,7$
Ph15a2,5	12,25 $\pm 0,6$	$<0,001$ $>0,05$	21,8 $\pm 1,1$	$<0,01$	44,5 $\pm 1,9$
Ph15a5	14,8 $\pm 0,8$	$<0,001$ $>0,05$	26,4 $\pm 0,8$	$<0,01$	45,0 $\pm 3,7$
Ph15a12	28,2 $\pm 5,7$	$<0,05$ $<0,001$	36,8 $\pm 4,9$	$>0,05$ $<0,001$	44,0 $\pm 4,2$
Ph15a22	32,6 $\pm 3,3$	$<0,05$ $<0,001$	39,4 $\pm 2,7$		49,4 $\pm 2,9$
Ph15a50	44,2 $\pm 1,9$	$>0,05$ $<0,001$	42,0 $\pm 1,4$		47,8 $\pm 2,1$
K_{alt}	24,3 $\pm 2,6$	$<0,002$	28,8 $\pm 2,3$		33,3 $\pm 1,0$
Ph18Wo	9,5 $\pm 1,3$	$<0,001$ $<0,01$	13,8 $\pm 1,3$		59,3 $\pm 3,4$
Ph30Wo	6,8 $\pm 0,9$	$<0,001$ $<0,01$	12,8 $\pm 1,0$		62,2 $\pm 4,8$

Literaturverzeichnis

- BACE, E.G., SADNIK, I.L., PILGRIM, C. and MAURER, W.:
Autoradiographic Study of DNA-Synthesis in the Regenerating
Liver of the Mouse.
Virchows Archiv, path. Anat., Experimental Cell Research
(1964)
- BARKA, T. and POPPER, H.:
Medicine (Baltimore), 46, 103 (1967),
zit. PAULINI, G., BENEKE und KULKA, R.:
Lebervergrößerung durch Phenobarbital in Abhängigkeit vom
Lebensalter,
Beitr. Path. Bd. 141, 327 (1970)
- BUCHER, O.: Die Amitose der tierischen und menschlichen Zelle,
Protoplasmatologica Bd. IV E 1 wien: Springer 1959
- BUCHER, O. et SUPPAN, P.:
Amitose et fusion nucleaires au cours du rythme cardian.
The Cellular Aspects of Biorythms, Springer-Verlag 1968
- BUCHER, Th. and KLINGENBERG, M.:
Weg des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation.
Angew. Chem. 70, 552 (1958)
- BURGER, P.C., HERDSON, P.B.:
Phenobarbital-induced fine structural changes in rat liver.
Am. J. Path. 48, 793 (1968)
- CONNEY, A.H., DAVIDSON, C., GASTEL, R. and BURNS, J.J.:
Adaptive Increases in drug-metabolizing Enzymes induced
by Phenobarbital and other Drugs
J. Pharmacol. exp. Ther. 130, 1 (1960)

CONNEY, A.H. and GIMANN, A.G.:

Puromycin inhibition of Enzyme Induction by 3-Methylcholanthrene and Phenobarbital.

J. Biol. Chem. 238, 3682 (1963)

FOOTS, J.R. and ROGERS, C.A.:

Morphological Changes in the Liver, accompanying Stimulation of microsomal Drug Metabolizing Enzyme Activity by Phenobarbital, Chlordane, Benpyrene or Methylcholanthrene in Rats

J. Pharmacol. exp. Ther. 147, 112 (1965)

GARNER, R.C. und MC LEAN, A.E.M.:

Increased Susceptibility To Carbon Tetrachloride Poisoning In The Rat After Pretreatment With Oral Phenobarbitone
Biochem. Pharmac., 18, 645 (1969)

GOLDBERG, L.: Liver enlargement produced by drugs: its significance. Proc. Eur. Soc. für the study of drug toxicity Vol. VII, 171 (1966)

GRUNDMANN, E.: Intra-und extrazelluläre Faktoren bei der Tumorgenese

Arzneimittelforschung 18: 970-973 (1968)

GRUNDMANN, E. und SIEBURG, H.:

Die Histogenese und Cytogenese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild
Beitr. path. Anat. 126, 57 (1962)

HARRIS, H., MILLER, O.J., KLEIN, G., WORST, G., TACHIBANA, T.:
Suppression of Malignancy by Cell Fusion

Nature 223, 26 (1969)

HERDSON, P.B., GARVIN, P.J. and JENNINGS, R.B.:

Fine structural changes in rat liver induced by phenobarbital
Lab. Invest. 13, 1032 (1964)

KRÖNER, H., GUTENBERGER, B., HOLLMANN, S. und STAIB, W.:

Akute Phenobarbitalwirkungen auf den
Protein-und Nucleinsäurestoffwechsel der Rattenleber
2. Klin.Chem.Klin.Biochem. 7, 8 (1969)

KUNZ, W., SCHAUDE, G., SCHMID, W. und SIESS, M.:

Lebervergrößerung durch Fremdstoffe
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.u.exp.Path. 254, 470-488
(1966)

KUNZ, W. , SCHAUDE, G. und THOMAS, G.:

Die Beeinflussung der Nitrosamincarcinogenese durch
Phenobarbital und Halogenkohlenwasserstoffe
Z. Krebsforsch. 72,291-304 (1969)

KUNZ, W., SCHAUDE, G. und SIESS, M.:

Differenzierung des Leberstatus bei chronischer Zufuhr
wachstumsauslösender Pharmaka
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak.Band 253,
Heft 1 (1966), s. 63, (29.Tg.d.Dtsch.Pharmak.Ges.vom
27.-30.Sept. 1965 in Göttingen)

KUNZ, W., SCHAUDE, G., SCHMID, W. and SIESS, M.:

Stimulation of Liver Growth by Drugs
I. Morphological Analysis
Reprinted from Excerpta Medica International Congress
Series No. 115, Meeting in Rome, Italy, January 1966

KUNZ, W., SCHAUDE, G., SCHIMASSEK, H., SCHMID, W. and SIESS, M.

Stimulation of Liver Growth by Drugs
II. Biochemical Analysis
Reprinted from Excerpta Medica International Congress Series
No. 115. Volume VII of Proceedings of the European Society
for the Study of Drug Toxicity, Meeting in Rome, Italy,
January 1966

KUNZ, W., SCHAUDE, G. und THOMAS, C.:

Die Beeinflussung der Nitrosamincarcinogenese durch
Phenobarbital und Halogenkohlenwasserstoffe

Z. Krebsforsch. 72, 291-304 (1969)

MC MANUS, J.F.A.: Histological Demonstration of Mucin after
Periodic Acid

Nature August 10, 1946, Vol. 158 (S.202)

NIESSING, J.: Nachweis körpereigener und pharmakologischer
Substanzen in Gewebezellen mit Hilfe der Ultraviolettmi-
kroskopie

Med. Inaugural-Dissertation, Marburg (1964)

ORRENIUS, S., ERICSSON, J.L.E. and ENSTER, L.:

J. Cell. Biol. 25, 627 (1965)

Zit. PAULINI, K., GRIMMEL, K., BENEKE, G.:

Die Anwendbarkeit der "Critical Mass"- Theorie für die
phenobarbitalinduzierte Lebervergrößerung

Beitr. Path. Bd. 142, 129 (1971)

PEHLEMANN, F.-W.: Die amitotische Zellteilung. Eine elektro-
nenmikroskopische Untersuchung an Interrenalzellen von
Rana temporaria L

Z. Zellforsch. 84, 516 - 548 (1968)

PETTE, D.: Plan und Muster im zellulären Stoffwechsel
Naturwissenschaften 597, 52 (1965)

PREIS, Chr., SCHAUDE, G. und SIESS, M.:

Histometrische Analyse der Lebervergrößerung nach
chronischer Einwirkung von Barbituraten und Halothan
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path.

254, 489-504 (1966)

PREIS, Chr.: Histometrische Untersuchungen über die
pharmakologisch induzierte Lebervergrößerung der Maus
Med. Inaugural-Dissertation, Marburg (1965)

REMMER, H. und MERKER, H.J.:

Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem
Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit
Phenobarbital

Klin. W'schr. 41, 276 (1963)

REMMER, H.: Drug-induced formation of smooth endoplasmatic
reticulun and of drug metabolizing enzymes.

Proceed. of the Europ. sec. f. the study of drug toxicity
Vol. IV, 57 (1964)

und MERKER, H.-J.: Vermehrte Bildung von endoplasmatischem
Reticulum in der Leberzelle unter der Wirkung von
Arzneimitteln

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.Pharmak. 245, 76
(1963a)

- Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem
Reticulum in der Leberzelle während der Behandlung mit
Phenobarbital

Klin. W'schr. 41, 276 (1963b)

SCHAUDE, G., SIESS, M., VOGELL, W. und NIESSING, J.:

Histologische, histochemische und elektronenmikroskopische
Befunde bei der durch Fremdstoffe induzierten Leberver-
größerung der weißen Maus

Acta histochem. Bd. 26, S. 185 - 201 (1967)

SCHUSTER, L. and HERSCHEL, J.:

J. Biol. Chem., 241, 5361 (1966)

Zit. PAULINI, K., BENEKE, G., KULKA, R.:

Lebervergrößerung durch Phenobarbital in Abhängigkeit vom
Lebensalter

Beitr. Path. Bd. 141, 327 (1970)

STEGMANN, H. und PEINE, D.:

Quantitativ-morphologische Untersuchungen über das

Leberzellwachstum unter Follikelhormonwirkung

Dtsch. med. Welt 20, 1427 (1960)

Lebenslauf

Am 13.10.1939 wurde ich als Tochter des Landwirtes Adolf Wiesner und seiner Ehefrau Else geb. Wolkenstein in Trschons (Polen) geboren.

Die Volksschule besuchte ich 6 Jahre in Werdau (DDR).

Nach 3-jährigem Besuch einer Erwachsenenbildungsanstalt in Karl-Marx-Stadt legte ich dort 1960 die Reifeprüfung ab.

Ich begann das Medizin-Studium 1960 in Jena, wo ich im Juni 1961 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Februar 1963 die ärztliche Vorprüfung bestand. Von 1964 - 1965 arbeitete ich im pharmakologischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität in Jena (Direktor: Prof. Dr. Anker-mann) an einer Promotionsarbeit. Ende 1965 mußte ich aus politischen Gründen mein Studium in Jena abbrechen.

1966 heiratete ich den damaligen Soziologie-Studenten Hans-Jörg Palme.

Im Wintersemester 1966/67 setzte ich mein Studium in Marburg fort und legte das Staatsexamen im Sommersemester 1968 ab.

Im Oktober 1968 begann ich am Pharmakologischen Institut der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. Schmid) meine vorliegende Doktorarbeit.

Nach Ableistung meiner Medizinalassistentenzeit in der Marburger Chirurgischen und Medizinischen Universitäts-Klinik arbeitete ich 1 Jahr in der Klinik für Strahlentherapie und Röntgendiagnostik. Seit Juni 1971 arbeite ich an der Universitäts-Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie in Marburg. Ich beabsichtige den Facharzt für Kinder- und Jugendpsychiatrie zu erwerben.

Herrn Prof. Dr. W. Schmid danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Ebenso danke ich Frau Dr. med. habil. G. Schaudé für die selbstlose Unterstützung in allen die Arbeit betreffenden Fragen und die zahlreichen Anregungen für die Bearbeitung des Themas.

Herrn Dr. Overhof danke ich für die Durchführung der statistischen Auswertung.

Meine akademischen Lehrer waren die
Dame und die Herren Professoren:

In Jena: Albrecht, Ankermann, Becker, Bolck,
Eitner, Ehrhard, Frunder, Geyer,
Goetze, von Kaiserling, Klumbies,
Langhoff, Möbius, Neubert, Plenert,
Schwarz, Seidel, Urbach, Voss

In Marburg: Berendes, Bommer, Buchholz, Gedigk,
Jacob, Linneweh, Martini, Schmid,
Schwaiger, Streicher, Stutte.

